



TITLE:

# HyperthermiaにおけるFree Radicalsの細胞障害に関する研究

AUTHOR(S):

魏, 秀復

---

CITATION:

魏, 秀復. HyperthermiaにおけるFree Radicalsの細胞障害に関する研究.  
日本外科宝函 1984, 53(6): 742-755

ISSUE DATE:

1984-11-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208814>

RIGHT:

# Hyperthermia における Free Radicals の 細胞障害に関する研究

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：半田肇教授）

魏 秀 復

〔原稿受付：昭和59年8月21日〕

## Significance of Free Radicals in the Cytotoxic Process of Hyperthermia

HIDEFUKU GI

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

The author investigated the effects of hyperthermia on the generation of free radicals and its cytotoxicity by using a rat neurogenic tumor (T<sub>1</sub>) cells and hot water bath hyperthermia. Hydroxyl radicals were measured by bleaching of p-nitrodimethylaniline, and superoxide radicals were measured by reduction of nitroblue tetrazolium.

The production of radicals were increased on hyperthermia. Hydroxyl radicals produced by hyperthermia at 42 degrees centigrade for 30 min were equivalent to those produced by Linac irradiation of 1200-1400 rad. The combined use of 120  $\mu$ g/ml of superoxide dismutase (SOD) and 100  $\mu$ g/ml of catalase significantly inhibited the decrease of colony formation after hyperthermia at 42 degrees centigrade for 30 min, while either enzyme alone showed no effects. This result suggested that hydroxyl radicals play a role in the mechanism of cytotoxicity of hyperthermia.

The influence of several kinds of radical scavengers in relation to hyperthermia was studied. Dimethylsulfoxide (DMSO) significantly decreased the cytotoxicity due to hyperthermia at the same concentration that protected the cytotoxicity due to irradiation. Mannitol tended to inhibit the cytotoxicity of hyperthermia at 10mM concentration. Misonidazole, which is an electron affinic radiosensitizer, showed no synergism with hyperthermia in this system where the cells were aerobic. Vitamin E did not affect the cytotoxicity of hyperthermia. On the other hand, vitamin C, which is known to produce a large amount of various radicals during self-oxidation, markedly enhanced the cytotoxicity of hyperthermia at 45 degrees centigrade, depending on concentrations.

The results of these studies suggest that free radicals take important part in the cytotoxic

---

Key words: Hyperthermia, Free Radicals, Cytotoxicity, Scavengers.

索引語：ハイパーサーミア、フリーラジカル、細胞障害、スカベンジャー。

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

process of hyperthermia. It is likely that free radicals depress or inhibit the repair of sublethal damage of DNA which has been brought about by hyperthermia, or enhance the lethal damage. In order to further establish the significance of free radicals in the cell killing process in hyperthermia, it is more important to investigate the fundamental mechanism at the electron and molecular levels.

## 要 旨

ラット脳腫瘍 (neurinoma) 細胞 T<sub>1</sub> を用いて、42°C 加温時の hydroxyl radicals の産生増加を p-nitrodimethylaniline の 440 nm における bleaching を測定することによって、また superoxide radicals の増産を NBT 法によって検討した。superoxide dismutase (SOD), catalase, dimethylsulfoxide (DMSO), mannitol, vitamin E, vitamin C, misonidazole などの各種 scavenger の hyperthermia (以下 HT と略す) の cytotoxicity に与える影響を soft agar overlay method による colony formation および <sup>51</sup>Cr release assay によって検討した。

SOD と catalase は、それぞれ単独では HT の cytotoxicity に影響を与えないが両者を同時作用させれば有意に cytotoxicity を減弱させた。DMSO は 1 mg-10 mg/ml 濃度で有意に cytotoxicity を減弱させたが mannitol は 10 mM 濃度で cytotoxicity を減弱させた。vitamin E は HT の cytotoxicity には何ら影響を与えなかったが、vitamin C は濃度依存性に cytotoxicity を増強した。misonidazole は 10 mg/ml で前処置した aerobic cells には HT による cytotoxicity には影響しなかった。しかし 10 mg/ml misonidazole に浮遊させた場合 aerobic cells でも著明な cytotoxicity の増強を認めた。この一連の研究と文献の考察より、HT の cytotoxic mechanism に free radicals が関与している可能性が示唆された。最後に free radicals の面から HT の脳神経外科領域における臨床応用について若干の考察を加えた。

## 緒 言

熱による腫瘍縮小効果はすでに1866年 Busch<sup>12)</sup> によって報告され、その後1883年 Fehleisen<sup>25)</sup>、1893年 Coley<sup>20)</sup> らによって温熱効果が報告されている。しかしながら積極的に腫瘍を加熱し熱による腫瘍致死効果を期待しつつ臨床に応用し、HT による cytotoxicity に関して科学的検討がなされ始めたのは、最近の10年と

言っても過言ではない<sup>48,50)</sup>。

近年の加温装置の改良、温度測定法の長足の進歩に助けられ多くの臨床領域において温熱療法 (hyperthermia) が、外科療法、内科療法、放射線療法、免疫療法に次ぐ一つの補助療法としての期待が高まってきた。しかしながら抗腫瘍効果が発現する温度の下限域と正常組織の熱に耐え得る温度上限域とは近接しており、腫瘍細胞の熱感受性が正常細胞より高いとしても、正常組織の熱による損傷は HT の臨床応用に際しての最大の問題であり<sup>16)</sup>、治療効果を高めるには腫瘍組織の一層の加温を余儀なくされ、ひいては周辺正常組織が過度の加温により傷害される危険性も高まることになる。

温度処理と不活性エネルギーの関係は 41°C-42.5°C までの間は 365 Kcal/mole、43°C-46°C までの間は 148 Kcal/mole と計算され、ある種の蛋白質、酵素を変化させ得るに足る場合の 110-198 Kcal/mole にほぼ一致し<sup>56)</sup>、正常細胞とも言えども熱エネルギーには反応 (致死) せざるを得ない。しかしながら放射線療法および化学療法と HT とを併用すれば相乗効果が期待されることが判かり、にわかに臨床応用研究が盛んに行われるようになった<sup>35,37,39)</sup>。すでに radioresistant cancers に対する放射線療法と HT の併用療法による秀れた臨床成績が報告されている<sup>34)</sup>。

しかし HT が生体を高温という非生理的な環境下におき熱による細胞障害をあつかうにもかかわらず、著者の知りえた範囲ではいまだに HT を free radical の観点から論じた研究は極めて少ない<sup>19,31,42)</sup>。高温下では生理的狀態では進行しない反応が進み、蛋白質、脂質、核酸が radical 化する可能性がある。したがって HT によって産生された free radicals の細胞障害に及ぼす影響について調べることは HT の作用機序の解明に役立つものと考え、以下の研究を行った。

本研究では熱そのものによる細胞障害が比較的にくい 42°C 付近の HT において、superoxide radical と hydroxyl radical について、特に各種の scavenger の、HT による細胞障害に及ぼす影響、ならびに rad-

ical 関連薬剤と thermal damage との関係を検討し、若干の知見を得たので報告する。また脳神経外科領域における HT 応用の際の radical の意義に関して考察を加える。

## 実験材料および実験方法

### 1. 材 料

#### A. 腫瘍細胞

Oda ら<sup>60)</sup>が Fibiger laboratory (Denmark) において Wister Fibiger 系ラットに ethylnitrosourea 経胎盤投与によって誘発させたラット脳腫瘍細胞 (T<sub>1</sub>) を当施設で継代維持している培養細胞を使用した。

#### B. 使用薬剤

- a) superoxide dismutase (SOD): 東洋醸造, HM-81 I
- b) catalase: Sigma
- c) p-nitrodimeylaniline (p-NDMA): 東京化成工業
- d) dimethylsulfoxide (DMSO): 東京化成工業
- e) misonidazole: 日本ロシュ, Ro-07-0582
- f) mannitol (D-mannitol): 杏林製薬
- g) vitamin C (アスコルビン酸): 武田製薬
- h) vitamin E (D- $\alpha$ -tocopherol): エーザイ
- i)  $\beta$ -nicotinamido adenine dinucleotide, reduced form (NADH): Sigma
- j) phosphate methosulfate (PMS): 東京化成工業
- k) nitroblue tetrazolium (NBT): Sigma
- l) agar: Difco
- m) trypsin: Sigma
- n) ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA): 半井
- o) <sup>51</sup>Cr (Na<sub>2</sub> <sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>): 日本ラジオアイソトープ協会

#### C. 使用機器

- a) ライナック: 三菱, ML-15 M III
- b) hot water bath: 東京理科研, EYELA-5 B-24
- c) gamma camera: Aloka, ARC 500
- d) 分光光度計: 日立, autospectrophotometer 340

### 2. 実験方法

#### A. hydroxyl radical 測定法

Bors ら<sup>9)</sup>の方法に従い p-NDMA と hydroxyl radical との反応を調べることによって, hydroxyl radical の産生を測定した。継代培養中の T<sub>1</sub> 細胞を 0.1%

trypsin+0.01% EDTA にて 37°C, 5 分間処理し single cell suspension を作製し phosphate buffer solution (PBS) で 3 回洗浄した後  $1.0 \times 10^6$ /ml となるように 0.1 mM p-NDMA/PBS 溶液に T<sub>1</sub> 細胞を浮遊させた。これを 5 ml ずつ試験管に入れ hot water bath にて 39°C-45°C の加温を 30 分, 60 分印加後すぐに 4°C, 1500 cpm, 3 分間の遠沈をして細胞成分を分離し, 上清を日立 autospectrophotometer を使い 440 nm の吸光度を測定した。実験は 3 回ずつ行い統計処理した。Oyanagi<sup>62)</sup>の方法に準じて各温度の測定値の比較のために stimulation ratio を以下の式により計算した。

stimulation ratio =

$$\frac{A(\text{HT, sol. with cells}) - A(37^\circ\text{C, sol. with cells})}{A(\text{HT, sol. without cells}) - A(37^\circ\text{C, sol. without cells})}$$

A: 440 nm の吸光度

HT: hyperthermia

sol: 0.1 mM p-NDMA/PBS

#### B. 放射線照射と hyperthermia 印加における hydroxyl radical 産生量の比較

T<sub>1</sub> 細胞を 0.1% trypsin+0.01% EDTA 処理後洗浄し 0.1 mM p-NDMA/PBS に  $1.0 \times 10^6$ /ml となる single cell suspension を作製し 5 ml ずつ 2 群にわけ一方は 42°C, 30 分の hot water bath 加温を, 他方は 100 rad-1400 rad の線量でライナック照射をした。照射方法は 0.1 mM p-NDMA/PBS 溶液のみの対照群と共に試験管立てに各群 3 本ずつ立て, 均一に同一線量が照射されるように約 20°C の水道水に浸した状態で側方より照射した。加温群の control は, T<sub>1</sub> 細胞を含む溶液に 30 分間室温で放置したものとした。加温終了, またはライナック照射終了後ただちに 4°C, 1500 cpm, 3 分間の遠沈にて細胞成分を分離し上清の吸光度を測定した。

比較のため % bleaching を以下の如く計算し統計処理した。

% bleaching =

$$\frac{A(\text{Dn without cells}) - A(\text{Dn with cells})}{A(\text{cells, room temp}) - A(\text{cells, HT})} \times 100$$

A: 440 nm の吸光度

Dn without cells: 0.1 mM p-NDMA/PBS に

Dn 線量照射したもの

Dn with cells: T<sub>1</sub> 細胞を含む 0.1 mM p-

NDMA/PBS に Dn 線量照射したもの

cells, room temp:  $T_1$  細胞を含む 0.1 mM p-NDMA/PBS を室温で30分間放置したもの  
cells, HT:  $T_1$  細胞を含む 0.1 mM p-NDMA/PBS を 42°C 30分間の加温をしたもの

### C. superoxide radical の測定法

Nisikimi ら<sup>68)</sup> および Ponti ら<sup>67)</sup> の方法に準じて NADH, phosphate methosulfate (PMS) 存在下における nitroblue tetrazolium (NBT) の還元程度から superoxide radical を測定した。

0.05 M Tris-buffer (pH 7.4) に最終濃度が 92  $\mu$ M NADH, 80  $\mu$ M NBT,  $T_1$  細胞を  $1.0 \times 10^5$ /ml となるよう調製し全量 5 ml となるように 5.2  $\mu$ M PMS を加え反応を開始させ、予め温度設定してある hot water bath にて加温した。各時間加温後 4°C, 1000 cpm, 3分間遠沈し、NBT の還元物質である diformazan と  $T_1$  細胞を分離し残った上清の % transmittance (%T) を分光光度計で測定した (560 nm)。すなわち、不溶性の diformazan が光を散乱させ、均一なデータが得られないために absorption でなく %T により superoxide radical を測定した。

absorption と %T の関係は

$$\%T = 100 \times t$$

$\log(1/t) = A$  ( $t$ : transmittance,  $A$ : absorption) と定義され、%T の上昇は NBT 還元の増加を示し superoxide radical 産生増加を意味することになる。

### D. soft agar overlay method による colony formation

#### i. agar layer の作製

(1) 下層 agar: 10% FCS 加 Eagle MEM (白水) に 0.03 g/l glycine, 0.3 g/l L-glutamine, 0.04 g/l L-serine, 1.5 g/l glucose, 0.86 g/l Eagle MEM amino acids and vitamins medium を加え最終濃度が 0.5% agar となるよう調製した。

(2) 上層 agar: 15% FCS, 0.3% agar としその他は全て下層と同一濃度となるよう調製した。

(3) 方法: Linbro 6穴プレートに下層 agar を 1 ml ずつ入れ、予め固めておきその上に処理した細胞を  $3.0 - 4.0 \times 10^4$ /well となるよう散布し、保温していた上層 agar を 1 ml ずつ静に流し込み重層させた。コロニーの算定は 8 日後に顕微鏡下に 20 個以上の細胞集塊を 1 コロニーとして算定した。

%コロニーを以下の式により計算し t 検定した。

$$\%コロニー =$$

$$\frac{\text{コロニー数}}{\text{コロニー数} + 20 \text{個未満の細胞集塊数}} \times 100$$

#### ii. 細胞処理方法

##### (1) SOD および catalase の影響

培養中の  $T_1$  細胞を 0.1% trypsin + 0.01% EDTA 処理し PBS で 2 回洗浄後  $6.0 \times 10^5$ /ml となるよう PBS で single cell suspension をつくり全量を 5 ml となるように SOD, catalase を加え以下の 4 群を調製した。1: HT+SOD (120  $\mu$ g/ml), 2: HT+catalase (100  $\mu$ g/ml), 3: HT+SOD (120  $\mu$ g/ml)+catalase (100  $\mu$ g/ml), 4: HT 単独, の 4 群である。HT は 42°C 15分と30分 hot water bath で行った。

##### (2) mannitol の影響

同様の方法で  $T_1$  細胞の single cell suspension をつくり細胞濃度は  $1.0 \times 10^6$ /ml PBS とした。これに mannitol を加え 1 mM, 10 mM, 100 mM とし全量を 5 ml とした。HT は 42°C 15分と30分 hot water bath で行った。

##### (3) DMSO の影響

$T_1$  細胞の single cell suspension をつくり PBS で 2 回洗浄後  $1.0 \times 10^6$ /ml となるように  $T_1$  細胞を 10% FCS 加 Eagle MEM に浮遊させた。これにオートクレーブで滅菌した DMSO を 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml となるよう加え全量を 5 ml にして hot water bath にて各時間加温した。

##### (4) vitamin E の影響

$T_1$  細胞の  $1.0 \times 10^6$ /ml PBS の single cell suspension を調製し vitamin E を 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml となるよう加え全量を 5 ml として hot water bath にて各時間加温した。

##### (5) misonidazole の影響

5 cm<sup>2</sup> tissue culture flask に 5 ml の 10% FCS 加 Eagle MEM で培養中のなかに直前に 100°C の蒸留水で溶かした misonidazole を 10 mg/ml となるように添加し、37°C, 3% CO<sub>2</sub>, 100% humidity で 60分, 120分培養し、0.1% trypsin + 0.01% EDTA 処理後、PBS で 3 回洗浄した。この 2 群の  $T_1$  細胞をそれぞれ PBS  $1.0 \times 10^6$ /ml に再浮遊させ hot water bath 加温した。また一方、同じ培養細胞を  $1.0 \times 10^6$ /ml 濃度の single cell suspension をつくり、misonidazole 10 mg/ml となるよう添加し、同様に hot water bath で加温した。

### E. $^{51}\text{Cr}$ release assay による vitamin C の hyperthermia による影響

培養中の  $T_1$  細胞を trypsin, EDTA 処理し 2% FCS 加 Eagle MEM で 3 回洗浄後,  $1.0 \times 10^7/\text{ml}$  の  $T_1$  細胞を 10% FCS 加 Eagle MEM の 0.5–1.0 ml に浮遊させ,  $^{51}\text{Cr}$  (0.1 mCi/0.1 ml) を加え,  $37^\circ\text{C}$ , 60 分 incubate して label した $^{51}$ . 2% FCS 加 Eagle MEM で 3 回洗浄後 10% FCS 加 Eagle MEM に  $1.0 \times 10^5/\text{ml}$  となるよう再度浮遊液をつくり vitamin C を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と SOD 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加群をつくり全量 5 ml ずつとした.  $45^\circ\text{C}$  の hot water bath で各時間加温した. 加温処理後速やかに cold room で 1000 cpm, 5 分間遠沈し, 上清の  $^{51}\text{Cr}$  をガンマカウンターで count した. count 値は二つの specimen の平均値をとった. % specific  $^{51}\text{Cr}$  release は以下の計算式によった.

% specific  $^{51}\text{Cr}$  release =

$$\frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

なお maximum release は NP-40 detergent を加え incubation した.

## 結 果

### A. hydroxyl radical の産生

$T_1$  細胞を含まない 0.1 mM p-NDMA 溶液 (solution without cells) の加温では bleaching は全く認められず, bleaching は  $T_1$  細胞を含む溶液 (solution with cells) においてのみ認められた.  $37^\circ\text{C}$  における solution with cells の bleaching は極めて緩徐に進行したが, 加温すれば速やかに bleaching は進行した. 温度上昇に比例して直線的に stimulation ratio は増加した.  $42^\circ\text{C}$  60 分加温で stimulation ratio は約 2.0 を示し, 30 分では 1.75 を示した.  $45^\circ\text{C}$  60 分では 2.25 の増加を示したが,  $39^\circ\text{C}$  では 30 分加温も 60 分加温も 1.25 の stimulation ratio を示した. 温度上昇に伴って hydroxyl radical の産生量が増加した (Fig. 1).

### B. 放射線照射と HT の hydroxyl radical 産生量の比較

0.1 mM p-NDMA 溶液のみライナック照射したものの bleaching は極めて僅かであり無視できた. このため  $T_1$  細胞を含む溶液のライナック照射による bleaching は, 低線量の場合には, 室温 30 分放置後の blea-

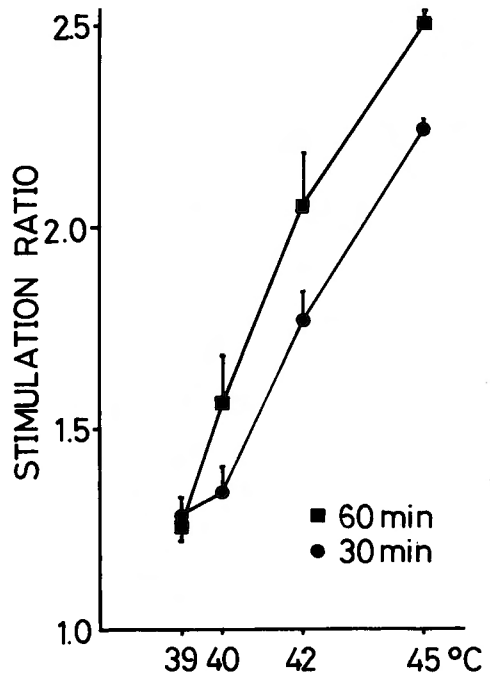


Fig. 1. Increase of stimulation ratio indicates the increased production of hydroxyl radicals from  $T_1$  cells by hyperthermia.

ching 値に及ばないため % bleaching はマイナスとなった.  $42^\circ\text{C}$  30 分加温と同等の hydroxyl radical を産生させるには, ライナック照射単独では 1200 rad 以上必要であった (Fig. 2).

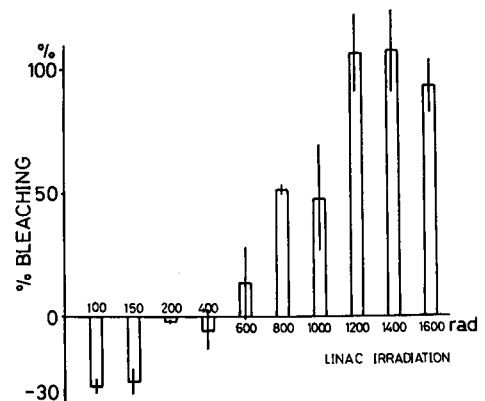


Fig. 2. Hydroxyl radicals produced from  $T_1$  cells by various doses of irradiation, as compared to that (100%) produced by  $42^\circ\text{C}$  Hyperthermia for 30 min. As far as the production of hydroxyl radicals is concerned,  $42^\circ\text{C}$  hyperthermia for 30 min corresponds to irradiation of 1200 rad or more.

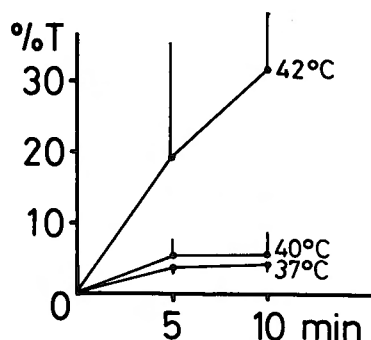


Fig. 3. The production of superoxide radicals as expressed as %T is markedly increased by 42°C hyperthermia, while it is not increased by 37°C or 40°C hyperthermia.

### C. superoxide radical 産生の検討

T<sub>1</sub>細胞を含まない溶液のみの NBT の還元は 37°C, 40°C 加温とも 5 分以上経過すればプラトーになり, 20 分まではほぼ同じ値を示した。NBT の還元は 5 分までではほぼ終了し, superoxide radical の加温による産生増加は細胞を含まない溶液のみでは認められなかった。T<sub>1</sub>細胞を含む溶液の加温は 37°C, 40°C では加温時間による増加は認められず, 42°C において直線

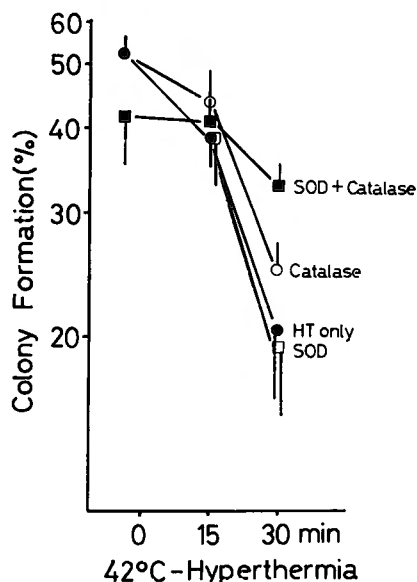


Fig. 4. The co-existence of SOD and catalase inhibits more markedly the cytotoxicity of 42°C hyperthermia than by either enzyme alone. SOD: superoxide dismutase (120 µg/ml), catalase (100 µg/ml), HT: hyperthermia (42°C).

的に増加し HT による superoxide radical の産生増加が考えられた (Fig. 3).

### D. SOD, catalase, DMSO, mannitol, vitamin E, misonidazole の HT の cytotoxicity に与える影響の検討

#### (1) SOD および catalase の影響

HT+SOD 群, HT+catalase 群, HT+SOD+catalase 群, HT 単独群とも 42°C, 15 分の加温では colony formation に有意の差を示さなかったが, 30 分加温において HT+SOD+catalase 群は有意に HT 単独群の colony 形成率より高かった ( $p < 0.05$ ). HT+SOD 群, HT+catalase 群の colony 形成率は HT 単独群と有意差はなかった。つまり SOD, catalase の単独では HT の cytotoxicity には影響を与えなかったが, SOD と catalase の同時作用では有意に HT の cytotoxicity を阻害した (Fig. 4).

#### (2) mannitol の影響

42°C 15 分加温において mannitol 1 mM, 10 mM の濃度での colony 形成率は HT 単独群と有意差はなかったが, 100 mM 濃度では HT 単独群より有意に

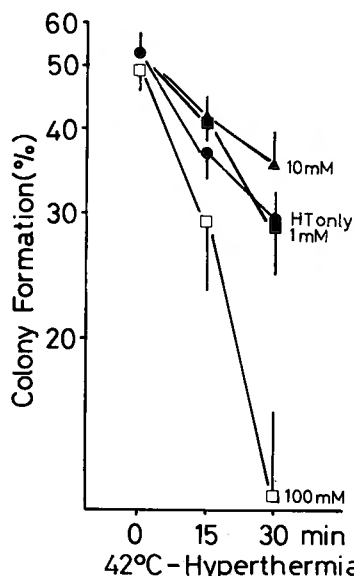


Fig. 5. The protective effect of mannitol on the cytotoxicity due to hyperthermia. 10 mM mannitol inhibits the cytotoxicity of 42°C hyperthermia ( $p < 0.1$ ) better than 1 mM. There seems to be a particular range of concentration of mannitol to show an inhibitory effect against hyperthermia.

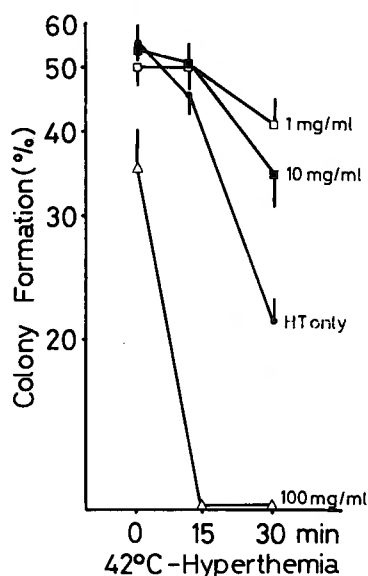


Fig. 6. DMSO in the concentration of 1 mg/ml inhibits more effectively the cytotoxicity due to 42°C hyperthermia, than in the concentration of 10 mg/ml. There seems to be a particular range of concentration of DMSO to show an inhibitory effect against hyperthermia.

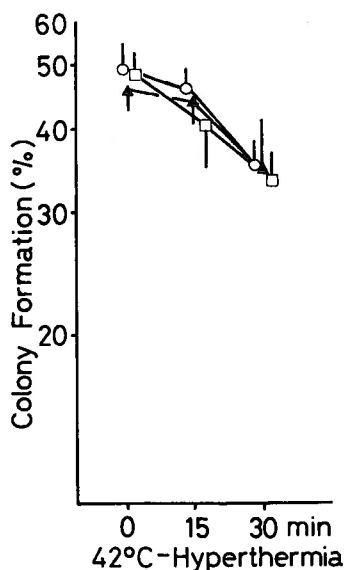


Fig. 7. Vitamin E with the concentrations ranging 2.5-5.0 mg/ml does not affect the cytotoxicity of 42°C hyperthermia.  
○: control, ▲: vitamin E 2.5 mg/ml, □: vitamin E 5.0 mg/ml.

colony 形成率は低下した ( $p < 0.01$ ). 42°C 30分加温では, 1 mM 濃度で HT 単独群と有意差はなかった. 100 mM 濃度では有意 ( $p < 0.01$ ) に colony 形成率は低下した. 10 mM 濃度では  $p = 0.1$  で有意に HT 単独群より colony 形成率は高かった (Fig. 5).

### (3) DMSO の影響

DMSO 1 mg/ml, 10 mg/ml 濃度で 42°C, 15分加温では HT 単独群と colony 形成率に有意差はなかったが, 42°C, 30分加温では HT 単独群より有意に colony 形成率が高かった ( $p < 0.05$ ). 100 mg/ml 濃度では 42°C, 15分加温, 30分加温において colony 形成は認められなかった (Fig. 6).

### (4) vitamin E の影響

vitamin E 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml 濃度における colony 形成率は対照群と全く有意差はなく, 42°C 15分, 30分加温において vitamin E は hyperthermia の cytotoxicity には影響を与えなかった (Fig. 7).

### (5) misonidazole の影響

misonidazole 1 mg/ml で前処置し60分, 120分 up-

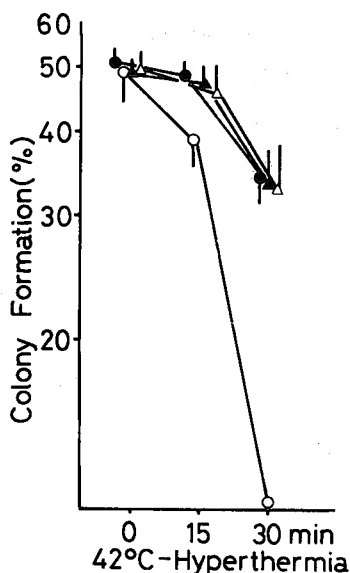


Fig. 8. Effects of misonidazole on hyperthermia. The aerobic  $T_1$  cells pretreated by misonidazole indicated no synergism with 42°C hyperthermia.

●: 42°C hyperthermia alone, ○: 42°C hyperthermia with 10 mg/ml misonidazole, ▲: 42°C hyperthermia after preincubation with 10 mg/ml misonidazole for 60 min, and △: 42°C hyperthermia after preincubation with 10 mg/ml misonidazole for 120 min.



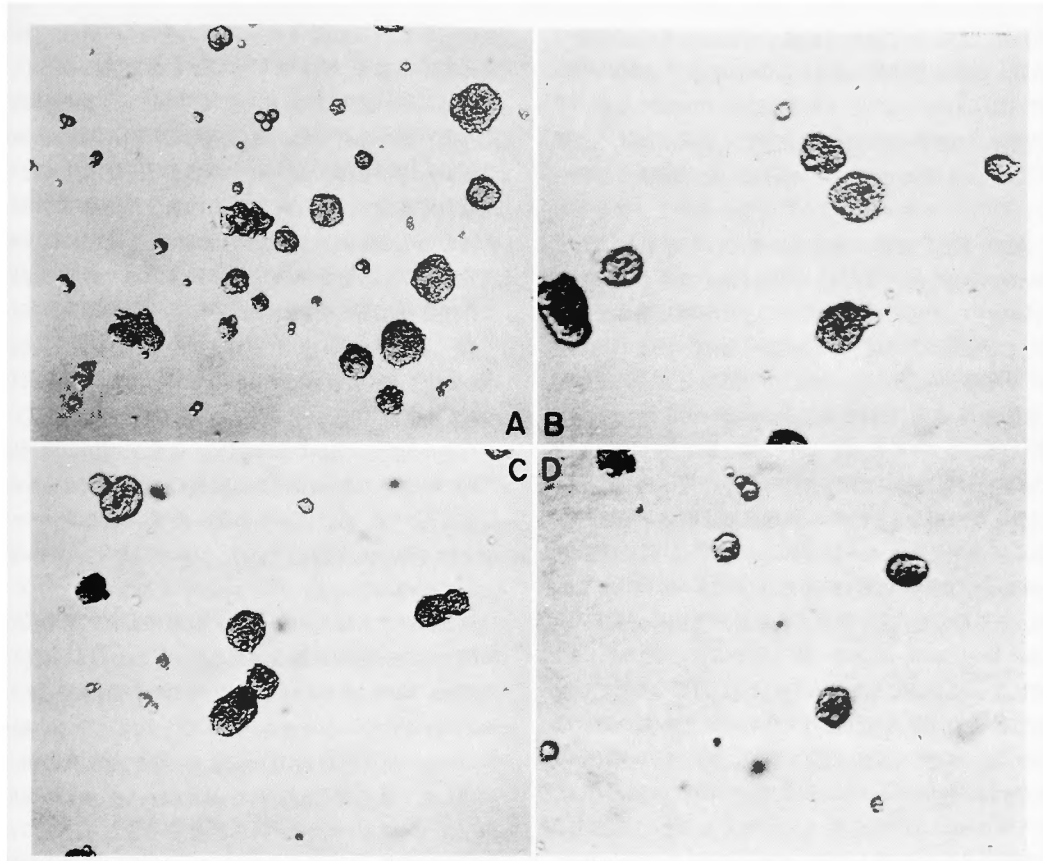


Fig. 9. Microphotographs of colony formation. 50 $\times$ .

A: control, B: 42°C hyperthermia for 30 min after preincubation with 10mg/ml misonidazole for 60 min, C: 42°C hyperthermia for 30 min alone, D: 42°C hyperthermia for 30 min with 10 mg/ml misonidazole.

take させた  $T_1$  細胞の 42°C 加温の colony 形成率は対照と有意差はなかったが misonidazole 10 mg/ml に

浮遊させ加温した  $T_1$  細胞の colony 形成率は15分、30分加温とも有意に低下した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 8, 9).

#### E. vitamin C と HT の相乗効果の検討

37°C, 15分-90分加温において, vitamin C 500  $\mu$ g/ml 添加群, SOD 120  $\mu$ g/ml 添加群は control と同程度の release しか示さなかった. 45°C 加温において vitamin C 添加群は濃度に依存して release が増加し 90分加温, vitamin C 濃度 500  $\mu$ g/ml では約80%の% specific  $^{51}\text{Cr}$  release を示した. SOD 添加群は対照とほぼ同じ release を示し HT の cytotoxicity を阻害しなかった (Fig. 10).

#### 考 察

hyperthermia (HT) の研究においては, dosimetry<sup>17,36)</sup> の概念が重要であり, 少なくとも“温度 $\times$ 時間”

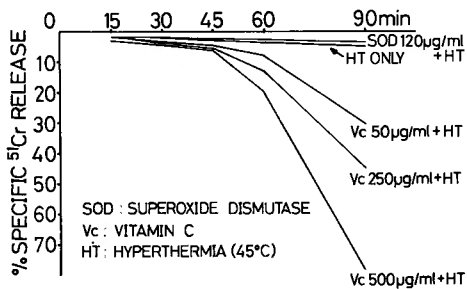
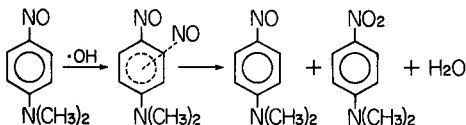


Fig. 10. % specific  $^{51}\text{Cr}$  release at 45°C showing that the addition of vitamin C (50 $\mu$ g/ml-500  $\mu$ g/ml) enhances the cytotoxicity due to hyperthermia in various degrees, depending on the concentrations, while SOD does not inhibit the cytotoxicity due to hyperthermia.

の他に加温される細胞 (組織) の状態の考慮が必要である。加温方法に関しては Lehman ら<sup>41)</sup> が1955年にすでに ultrasound と hot water heating による HT が与える cytotoxicity には加温方法による差はないと報告しており Marmor ら<sup>47)</sup> が同様の結果を報告している。

温度, 時間, 細胞の状態を一定にしても HT による細胞が吸収したエネルギーの量は確定できず HT の cytotoxicity を厳密に比較することは困難である。したがって今回の研究は <sup>51</sup>Cr release assay 法と DMSO の colony formation assay 法以外は全て同一調製の PBS (pH 7.3) に腫瘍細胞を single cell suspension の状態にし, hot water bath 加温を加え, 条件を極力統一した。組織により微妙な温度の差により感受性が少しずつ異なるが<sup>13,46)</sup> 処理温度と細胞不活化速度から不活化エネルギーは 41°C-42.5°C の間で 365 Kcal/mole, 43°C-46°C の間では 148 Kcal/mole であり, ある種の蛋白質, 酵素を変化させるのに必要な110-198 Kcal/mole にほぼ一致している<sup>46)</sup> ことから一般的に言って十分な加温がえられれば, HT は全ての細胞に致死的效果をもつと考えられる。そしてこの様な高エネルギーを細胞に負荷すれば, 熱エネルギーそのものによる lethal damage の他に free radical による cytotoxicity の可能性も充分に考えることができる。

hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxide radical ( $\text{O}_2^-$ ) の加温による産生増加をみるために, hydroxyl radical については Bors ら<sup>9)</sup> の p-NDMA を利用する方法に準じて測定した。p-NDMA は superoxide radical, singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) には反応せず hydroxyl radical とのみきわめて急速に反応 ( $1.25 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ) し黄色から無色になるため 440 nm の吸光度の変化を調べることで, hydroxyl radical の生成は比較的容易に測定することができる。



この方法により, hydroxyl radical の加温による産生増加が認められたが, hydroxyl radical そのものが HT 時の cytotoxicity にどの程度関与するかについては不明であり, このことに関する報告は著者の調べ得た範囲内では未だない。ある反応系が SOD と catalase を同時作用させた場合のみ反応系に阻害がかかるが, SOD もしくは catalase をそれぞれ単独に作用させて

も何ら影響がない場合 hydroxyl radical の関与が反応系にあるとする McCord<sup>49)</sup> の示した方法にもとずいて, HT の cytotoxicity における hydroxyl radical の関与の有無を検討した。その結果, SOD 120  $\mu\text{g/ml}$ , catalase 100  $\mu\text{g/ml}$  の scavenger として作用すると考えられる濃度で HT 印加時に両者を同時作用させた群においてのみ対照群に比べ colony 形成率の低下を有意に抑制し, しかも SOD 単独または catalase 単独に作用させても colony 形成率の低下を抑制できなかった。したがって, hydroxyl radical が HT による cytotoxicity に何らかの役割を果していることが判明した。

superoxide radical の加温による産生増加の検討は NBT の還元によってできる青色の diformazan を測定する NBT 法<sup>57)</sup>によったが, 著者の方法は intact の細胞を用いた実験系であり superoxide radical による反応のみならず, ミトコンドリア<sup>22,44,59)</sup> あるいは核に存在する種々の酸化還元酵素による影響を受け NBT が還元される難点がある<sup>4)</sup>。しかしながら Lin ら<sup>42)</sup>は,  $\text{Cu}^{2+}$  のキレート剤で SOD の阻害剤である dimethyldithiocarbamate (DDC)<sup>33)</sup> を使って chinese hamster cell を処理し HT による cytotoxicity を著明に増強したことを報告しており HT の cytotoxicity の作用機序に superoxide radical の関与を示唆していることから, HT による superoxide radical 産生増加は充分推定できる。また DDC は free radical を介して作用する抗癌剤である bleomycin の cytotoxicity を増強することも報告されている<sup>43)</sup>。

加温による scavenger 活性の低下については Ciborowski ら<sup>49)</sup>が chinese hamster lung cell の 43°C 加温における SOD activity は time dependent に低下することを示したが, Cu-Zn SOD そのものは, pH 7.0, 100°C, 5分間の煮沸でも活性はほとんど失われない<sup>57)</sup>。この事により加温による SOD 合成能の低下が考えられるが, 加温による SOD 活性低下が superoxide radical の相対的増加を引き起こすかどうかは不明である。さて DDC 処理後の SOD 活性低下の程度は  $2.2 \times 10^{-4} \text{ M}$  30分処理, 60分処理でそれぞれ31%, 55%の阻害を受ける<sup>42)</sup> としており, 正常組織と腫瘍組織の DDC 処理による SOD 活性の低下は, 頃末ら<sup>40)</sup>が報告しており, ラット腹腔内投与 (1 g/Kg) 後正常脳組織と移植脳腫瘍内の SOD 活性はそれぞれ48%, 79%阻害を受けるとし腫瘍内 SOD 活性の阻害がより強く受けることを示している。Peskin ら<sup>66)</sup>は癌

細胞の SOD 活性は正常細胞より低下している事を多くの癌細胞で示し, Petkau<sup>66)</sup> は, ラットの腫瘍で腫瘍周辺部と内部とでは低下の程度に違いがあることを示しており, 腫瘍の部分部分における SOD 活性の低下の差異は充分考えられる. 古くより catalase 活性は多くの腫瘍で低下していると考えられている<sup>70)</sup>が, 低下していないとする報告もある<sup>71)</sup>. 一般に free radical による cytotoxicity を考える場合腫瘍内部の SOD 活性, catalase 活性の低下は悪性腫瘍の治療にあたって好都合といえる.

free radical の target は DNA であり, DNA level の傷害が cytotoxicity を現わす<sup>45)</sup>. HT の DNA level での研究は, Corry ら<sup>21)</sup>が 41°C-43°C において DNA の sublethal damage, lethal damage を認め, Palzer ら<sup>64)</sup>は DNA, protein 合成阻害剤は HT の cytotoxicity を減弱させる事を認めており, Bronk ら<sup>11)</sup>はアルキル化剤の DNA 傷害は 42°C 以上で増強されることを示し, Ben-Hur ら<sup>6)</sup>は postirradiation hyperthermia において 41°C までは sublethal damage からの repair が阻害され, 41°C 以上では lethal damage の増強を報告している. また 42°C 以上では DNA polymerase が作動しなくなるという報告もある<sup>5)</sup>. Jonsson ら<sup>38)</sup>は, HT と radiation の併用効果を DNA 合成と NAD<sup>+</sup> レベルの観点から研究している, また McGhie ら<sup>50)</sup>は, DNA strand break の repair の研究から同様の結論を得ている. DNA level の sublethal あるいは lethal damage の mechanism を全て free radical に帰することはできないが少なくとも HT によって増産された free radical が DNA に影響を与えている可能性は疑う余地はない.

hydroxyl radical は superoxide radical から作られる radical で反応性は superoxide radical より速く cytotoxicity も強いと考えられており, 生体内で hydroxyl radical 産生を上げるものに vitamin C がある<sup>77)</sup>. vitamin C は自動酸化の過程で各種 free radicals を産生し<sup>7,55)</sup>, DNA 鎖の切断を起こすこと<sup>55)</sup>はよく知られている. このため抗菌, 抗ウィルス効果を発揮するが, 著者は vitamin C の hydroxyl radical 産生亢進作用に注目して vitamin C と HT との相乗効果を検討した. vitamin C は濃度依存性にその相乗効果を増強したが, trypan blue dye exclusion test では 45°C, 15分の加温で100%の細胞致死作用を示した. <sup>51</sup>Cr release assay との解離があるが, <sup>51</sup>Cr release assay では細胞膜が破壊されて初めて <sup>51</sup>Cr の release が成さ

れるために time lag が生じたためと考えられた. Murata ら<sup>54)</sup>はすでに bacteriophage において vitamin C の  $1 \times 10^{-4}$  M の濃度で 0°C-50°C で30分反応させることより phage の不活化が温度上昇に伴って増加することを認めている. これは vitamin C と HT の相乗効果を支持する報告である. Morgan ら<sup>53)</sup>は vitamin C の DNA 鎖切断は酸素依存性であり superoxide radical による DNA 切断は nM オーダーの濃度の SOD で阻害できるが, vitamin C による DNA 切断は mM オーダーの濃度の SOD でも阻害できず catalase によって初めて阻害できたことより vitamin C による DNA damage は hydroxyl radical によるものと考えている. 著者らも vitamin C 添加による HT 時に hydroxyl radical の産生増加を認めすでに報告している<sup>28)</sup>.

Morgan ら<sup>53)</sup>は superoxide induced DNA cleavage は 5 mM の DMSO によって83%阻害でき, 5 mM の mannitol の阻害率47%を大きく上まわったことを示した. DMSO は近年 hydroxyl radical scavenger としての効果<sup>69)</sup>が注目されており, Chapman ら<sup>15)</sup>は DMSO には radioprotection の効果があるという興味ある事実を報告している. 著者は本研究においてはほぼ同じ濃度の DMSO で HT の cytotoxicity を阻害しうること colony formation で示したがこれは HT の cytotoxicity の mechanism を考える上で極めて重要であると思われる.

Roots ら<sup>72)</sup>は radiation induced single-strand breaks は hydroxyl radical が主たる役割を担うことを示し, radical scavenger を用いた radioprotection が有用である可能性を示唆したが, scavenger の一種である cysteamine は放射線の細胞傷害を阻害し<sup>15)</sup>, また ultrasound による細胞傷害からも防御しうることが知られている<sup>3)</sup>. そして放射線増感剤である misonidazole の hypoxic cells に対する細胞傷害は温度依存性でありこの細胞傷害は cysteamine によって阻害される<sup>32)</sup>. cysteamine による radioprotection の mechanism の解明は Milvy<sup>52)</sup>が electron spin resonance を使って cysteamine の sulfhydryl protection の作用を核酸との関係で詳しく報告しており, HT の cytotoxicity も cysteamine によって阻害される可能性が推定される.

misonidazole は電子親和性物質で HT との細胞傷害の相乗効果については多くの報告がある<sup>8,32)</sup>. この misonidazole による作用は DNA damage の repair

の阻害<sup>68)</sup>または DNA radical の酸化による DNA 切断と考えられているが hypoxic な状態が必要である<sup>1)</sup>。著者の実験系では細胞を hypoxic にしなかったため cytotoxicity 増強効果は認めなかったが, misonidazole の 10 mg/ml 溶液に aerobic cells を浮遊させての加温では強い cytotoxicity を呈した。これは misonidazole が高濃度のため misonidazole 本来の細胞傷害作用がでたものと考えられた。

DMSO も 100 mg/ml 濃度では HT の細胞傷害を著しく増強したが, DMSO の denaturant agent としての効果が考えられた。DMSO に関しては 40°C 加温において vitamin A の細胞傷害を増強したという報告もある<sup>2)</sup>。また Bradham ら<sup>10)</sup>は DMSO による組織温度の上昇を認めている。

他の radical scavenger の HT に対する影響をみるために mannitol と vitamin E を用いて検討した。mannitol は hydroxyl radical scavenger としてよく知られているが 10 mM 濃度で HT の細胞傷害を阻害する可能性が示唆されたが, 高濃度での細胞傷害は osmotic damage によると考えられた。vitamin E は singlet oxygen scavenger と抗酸化作用があるが, HT の細胞傷害には影響を与えなかった。

hematoporphyrin derivative (HPD) は singlet oxygen を産生して細胞傷害作用<sup>23,26)</sup>を有し, 励起に光エネルギーを使って photoradiation therapy として臨床応用をめざして研究が行われている<sup>18,24)</sup>。著者らは HPD と HT の相乗効果について検討したが, 加温によるエネルギー<sup>56)</sup>が HPD を励起している可能性が考えられる<sup>29,30)</sup>。Suwa ら<sup>74)</sup>は hematoporphyrin と光のリポソーム膜への作用に superoxide radical の関与を考えており, singlet oxygen だけを HPD が産生する radical とすることはできない。

生体膜の HT による radical 化は膜の成分である磷脂質, 膜内部の飽和, または不飽和脂肪酸の構成成分から十分に想像されるところである。

Suzuki ら<sup>75)</sup>は, 放射線傷害を不飽和脂肪酸と  $K^+$  permeability について研究し membrane lipids の流動性の変化に注目している。HT による生体膜の流動性の変化についても free radical の細胞傷害とともに重要な問題であり今後注目しなければならない。中野ら<sup>87)</sup>は, 生体膜のラジカル化についての機序を詳しく示しているが, 著者の調べた範囲内では HT による膜のラジカル化と細胞傷害の関係についての報告はない。Chan ら<sup>14)</sup>は, 多価不飽和脂肪酸による super-

oxide radical の増加と膜脂質の過酸化と脳浮腫との関係を論じており, 脳神経外科領域における HT の臨床応用を考える場合には, 脳腫瘍周辺の脳浮腫が HT によって増悪する可能性が危惧される。また脳組織の加温は, 著者ら<sup>27)</sup>が報告したように著明な脳血流の増加を伴い 35°C-45°C において直線的に脳血流の増加を認めた。犬正常灰白質では 45°C で約 3 倍, 白質では約 2 倍正常温での脳血流量に比べて増加した。この事は酸素供給の増加を示し oxygen cellular tension<sup>63)</sup>の増加をきたしてより一層ラジカル化を促進すると思われる。脳腫瘍内部の血流も部位によっては異なっており<sup>78)</sup>, 加温により血流量の変化も一様でないと思われるが, 血流量の変化による radical 化についてはまだほとんど不明と言ってよい。

HT を含めての集学的治療法の報告<sup>73)</sup>もあるが, 一つの確立した治療法とするにはまだ多くの難問がある。今後加温方法, 温度分布測定, 腫瘍の熱に対する感受性, 耐性, dosimetry, 細胞傷害の機序, 他療法との併用効果の効果判定法, および加温による増殖促進効果<sup>30,76)</sup>などの諸問題点について, 今後更に研究を重ねて行く必要がある。

## 結 論

1. 42°C-hyperthermia (HT) により hydroxyl radicals, superoxide radicals の産生増加を認めた。
2. hyperthermia の細胞傷害機序に hydroxyl radicals の関与が認められた。
3. hydroxyl radical scavenger である DMSO は, 10 mg/ml 濃度で hyperthermia の細胞傷害を阻害した。mannitol は 10 mM 濃度で hyperthermia の細胞傷害を阻害する可能性を認めた。しかし高濃度では細胞傷害を増強した。
4. vitamin C は, 濃度依存性に hyperthermia の細胞傷害との間に相乗効果を認めたが, vitamin E は何ら影響を及ぼさなかった。
5. misonidazole は, aerobic 状態では hyperthermia の細胞傷害に影響を及ぼさなかった。
6. 以上より加温による free radicals の産生量増加を認め radical scavengers による hyperthermia の細胞傷害が有意に阻害されたことより hyperthermia の細胞傷害の作用機序に free radicals が関与していることが示唆された。

稿を終るにあたり懇篤な御指導と御校閲を賜りました京都大学脳神経外科教授 半田 肇先生に深甚なる感謝の意

を挙げます。また長きにわたり実験理論, データ解析に御指導頂きました京都大学脳神経外科講師 山下純宏先生に深謝の意を表します。そして実験に多くの協力を頂いた神戸中央市民病院脳神経外科 大塚信一先生, 京都大学放射線科助手 平岡真寛先生, 同放射線科 徐 志堅先生, 同放射線部技官 野原弘基氏に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Adams GE: Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *Br Med Bull* **29**: 48-53, 1973.
- 2) Ardenne Mv, Chaplain RA, et al: Selective krebszellenschädigung durch eine attackenkombination mit übersäuerung, hyperthermie vitamin A, dimethylsulfoxide und weiteren die freisetzung lysosomaler enzyme forernden agensien. *Arch Geschwst* **33**: 331, 1969.
- 3) Armour EP and Corry PM: Cytotoxic effects of ultrasound in in vivo dependence on gas content, frequency, radical scavengers, and attachment *Radiat Res* **89**: 369-380, 1982.
- 4) Azzi A, Montecucco C, et al: The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **65**: 597-603, 1975.
- 5) Ben-Hur E, Bronk BV, et al: Thermally enhanced radiosensitivity of cultured chinese hamster cells. *Nature New Biol* **238**: 209-210, 1972.
- 6) Ben-Hur E, Elkind MM, et al: Thermally enhanced radioresponse of cultured chinese hamster cells: inhibition of repair of sublethal damage and enhancement of lethal damage. *Radiat Res* **58**: 38-51, 1974.
- 7) Benon H, Bielski J, et al: Some properties of the ascorbate free radicals. *Ann NY Acad Sci* **258**: 231-237, 1975.
- 8) Bleen NM, Honess DJ, et al: Interaction of hyperthermia and the hypoxic cell sensitizer Ro-07-0582 on the EMT6 mouse tumours. *Br J Cancer* **35**: 299-375, 1977.
- 9) Bors W, Michel C, et al: On the nature of biochemically generated hydroxyl radicals. *Eur J Biochem* **95**: 621-627, 1979.
- 10) Bradham GB and Sample JJ: The vascular and thermal effects of dimethylsulfoxide. *Ann NY Acad Sci* **141**: 225-230, 1967.
- 11) Bronk BV, Wilkins RJ, et al: Thermal enhancement of DNA damage by an alkylating agent in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* **52**: 1064-1070, 1973.
- 12) Bush W: Über den Einflusse, welchen heftigere Erysepeln zuweilen auf orgnisierte Neubildungen ausüben. *Verh Naturh Preuss Rhein Westphal* **23**: 28-30, 1866.
- 13) Cavaliere R and Ciocatto EC: Selective heat sensitivity of cancer cells. *Cancer* **20**: 1351-1381, 1967.
- 14) Chan PH and Fishman RA: Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J Neurochem* **35**: 1004-1007, 1980.
- 15) Chapman JD and Reuvers AP: Chemical radio-protection and radiosensitization of mammalian cells growing in vivo. *Radiat Res* **56**: 291-306, 1973.
- 16) Chen TT and Heidelberger H: Quantitative studies on the malignant transformation of mouse prostate cells by carcinogenic hydrocarbons in vitro. *Int J Cancer* **4**: 166-178, 1969.
- 17) Christensen DA: Thermal dosimetry and temperature meausements. *Cancer Res* **39**: 2325-2327, 1979.
- 18) Christensen T, Feren K, et al: Photodynamic effects of hematoporphyrin derivative on synchronized and asynchronous cells of different origin. *Br J Cancer* **44**: 717, 1981.
- 19) Ciborowski LJ, Hwock L, et al: Effect of irradiation, hyperthermia, and in vitro condition on superoxide dismutase activity. *Radiat Res* **74**: 545, 1978.
- 20) Coley WB: The treatment of malignant tumors by repeated inoculation of erysipelas, with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* **105**: 488-522, 1893.
- 21) Corry PM, Robinson S, et al: Hyperthermic effects on DNA repair mechanism. *Radiology* **123**: 475-482, 1977.
- 22) Dionisi O, Galeotti T, et al: Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissue. *Biochem Biophys Acta* **403**: 292-300, 1975.
- 23) Dougherty TJ, Gomer CJ, et al: Energetics and efficiency of photoactivation of murine tumors cells containing hematoporphyrin. *Cancer Res* **36**: 2330-2333, 1976.
- 24) Dougherty TJ, Kaufman JE, et al: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* **38**: 2628-2635, 1978.
- 25) Fehleisen R: Die Atiologi des Erysipels. T Fischer Verlag, Berlin. 1883.
- 26) Foots CS, Denny RW, et al: Quenching of singlet oxygen. *Ann NY Acad Sci* **171**: 139-148, 1970.
- 27) 魏 秀復, 山下純宏, 他: 脳腫瘍に対する温熱療法. *日外宝* **51**: 654-655, 1982.
- 28) 魏 秀復, 大塚信一, 他: Hyperthermia と hydroxyl radical. *日外宝* **52**: 134-135, 1983.
- 29) 魏 秀復, 徳力康彦, 他: 不完全 hyperthermia による 脳腫瘍増殖促進効果と hematoporphyrin

- derivative (HPD) および hyperthermia の相乗効果について. 日外宝 **52**: 582-583, 1983.
- 30) 魏 秀復, 山下純宏, 他: hyperthermia と hematoporphyrin derivative (HPD) の相乗効果について. 癌と化学療法 **11**: 835-839, 1984.
- 31) 魏 秀復, 山下純宏, 他: Cytotoxicity of free radical in hyperthermia. 日外宝 (in press).
- 32) Hall EJ, Astor M, et al: Cytotoxicity of Ro-07-0582; Enhancement by hyperthermia and protection by cysteamine. Br J Cancer **35**: 809-815, 1977.
- 33) Heikkila RE, Cabbat FS, et al: In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. J Biol Chem **251**: 2181-2185, 1976.
- 34) Hiraoka M, Jo S, et al: Clinical results of RF hyperthermia combined with radiation in the treatment of radioresistant cancers. Cancer (in press).
- 35) Hornback NB, Shupe R, et al: Radiation and microwave therapy in the treatment of advanced cancer. Radiology **130**: 459-464, 1979.
- 36) Johnson R: Summary of the informal discussion of thermal dosimetry. Cancer Res **39**: 2328-2329, 1979.
- 37) Johnson RS: Hyperthermia, still experimental, may win place in cancer therapy. JAMA **245**: 1109-1116, 1981.
- 38) Jonsson GG, Eriksson G, et al: Effects of  $\gamma$  radiation and hyperthermia on DNA repair synthesis and level of NAD<sup>+</sup> in cultured human mononuclear leukocytes. Radiat Res **97**: 97-107, 1984.
- 39) Kim JH, Hahn EW, et al: Local tumor hyperthermia in combination with radiation therapy. Cancer **40**: 161-169, 1977.
- 40) 頃末和良, 穀内 隆, 他: 脳腫瘍治療における perfluorochemicals と放射線併用療法の基礎的研究. Neurol Med Chir **24**: 227-232, 1984.
- 41) Lehmann JF and Krusen FH: Biophysical effects of ultrasonic energy on carcinoma and their possible significance. Arch phys Med Rehabil **36**: 452-459, 1955.
- 42) Lin PS, Kwock L, et al: Diethyldithiocarbamate enhancement of radiation and hyperthermic effects on chinese hamster cells in vitro. Radiat Res **77**: 501-511, 1979.
- 43) Lin PS, Kwock L, et al: Copper, superoxide radicals, diethyldithiocarbamate, and bleomycin cytotoxicity. Lancet **1**: 177, 1979.
- 44) Loschen G, Azzi A, et al: Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide FEBS Lett **73**: 68-72, 1974.
- 45) Lown JW, Sim S-K, et al: Hydroxyl radical production by free and DNA-bound aminoquinone antibiotics and its role in DNA degradation. Electron spin resonance detection of hydroxyl radicals by spin trapping. Cancer J Biochem **56**: 1042-1047, 1978.
- 46) Marmor JB and Hahn GM: Tumor cure and cell survival after localized radiofrequency heating. Cancer Res **37**: 879-883, 1977.
- 47) Marmor JB, Pounds D, et al: Treatment spontaneous tumors in dogs and cats by ultrasound-induced hyperthermia. Int J Radiat Oncol Biol phys **4**: 967-973, 1978.
- 48) Matsuda T. (editor): Hyperthermic oncology. Proceeding of the sixth annual meeting of hyperthermia group of Japan, 1983.
- 49) McCord JM: Free radical and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science **185**: 529-530, 1974.
- 50) McGhie JB, Wold E, et al: Combined electron radiation and hyperthermia. Repair of DNA strand breaks in NIH 3T3 cells irradiated and incubation at 37, 42.5, or 45°C. Radiat Res **96**: 31-40, 1983.
- 51) Milder JW: Conference on hyperthermia in cancer treatment. Cancer Res **39**: 2231-2231, 1979.
- 52) Milvy P: Control of free radical mechanisms in nucleic acids systems: studies in radioprotection and radiosensitization. Fed Proc **32**: 1895-1902, 1973.
- 53) Morgan AR, Cone RL, et al: The mechanism of DNA strand breakage by vitamin C and the protective roles of catalase and superoxide dismutase. Nucleic Acids Res **3**: 1139-1149, 1976.
- 54) Murata A and Kitagawa K: Mechanism of inactivation of bacteriophage J1 by ascorbic acid. Agr Biol Chem **37**: 1145-1151, 1973.
- 55) 村田 晃: アスコルビン酸の不活性化作用—フリーラジカルによる核酸鎖切断—。蛋白, 核酸, 酵素 **20**: 33-41, 1975.
- 56) 中村 弥, 佐藤登紀子, 他: 癌に対する熱化学療法の実現. 癌と化学療法 **8**: 1-8, 1981.
- 57) 中野 稔, 松浦輝男, 他: スーパーオキシド O<sub>2</sub><sup>-</sup> 化学, 生物学, 医学—医歯薬出版, 昭和59年.
- 58) Nishikimi M, Rao NA, et al: The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun **46**: 849-854, 1972.
- 59) Nohl H and Hegner D: Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo. Eur J Biochem **82**: 563-567, 1978.
- 60) Oda Y, Handa H, et al: Induction and transplantability of rat neurogenic tumors. Arch Jpn Chir **46**: 513-520, 1977.
- 61) Otsuka S, Suda K, et al: Induction of killer activity following local irradiation in intracranial

- tumor-bearing mice. *Neurol Med Chir* **23**: 529-533, 1983.
- 62) Oyanagi Y: Inhibition of superoxide anion production in macrophages by anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* **25**: 1473-1480, 1976.
- 63) Palcic B and Skarsgard LD: The effect of oxygen on DNA single-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells. *Int J Radiat Biol* **21**: 417-433, 1972.
- 64) Palzer RJ and Heidelberger C: Influence of drugs and synchrony on the hyperthermic killing of Hela cells. *Cancer Res* **33**: 422-427, 1973.
- 65) Peskin AV, Koen YM, et al: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. *FEBS Lett* **78**: 41-45, 1977.
- 66) Petkau A, Monasterski LG, et al: Modification of superoxide dismutase in rat mammary carcinoma. *Res Commun in Chemical Pathol & Pharmacol* **17**: 125-132, 1977.
- 67) Ponti V, Dianzani MU, et al: Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulphate. *Chem-Biol Interactions* **23**: 281-291, 1978.
- 68) Rajaratnam S, Ian JS, et al: Preincubation with electron affinic radiosensitizers followed by hyperthermia or X rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **8**: 767-770, 1982.
- 69) Rao VP, Hari MS, et al: Role of hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* **11**: 599-607, 1976.
- 70) Reid E: 癌の生化学, 共立出版, 昭和46年.
- 71) Reid E: Significant biochemical effects of hepatocarcinogens in the rat: a review. *Cancer Res* **22**: 398-430, 1962.
- 72) Roots R and Okada S: Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *Int J Biol* **21**: 329-342, 1972.
- 73) Salzman M, Kaplan RS, et al: Aggressive multimodality therapy based on a multicompartmental model of glioblastoma. *Surgery* **92**: 250-259, 1982.
- 74) Suwa K, Kimura T, et al: Reaction of singlet molecular oxygen with cholesterol in a phospholipid membrane matrix. A model for oxidative damage of membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **75**: 785-793, 1977.
- 75) Suzuki S and Akamatsu Y: Involvement of membrane lipids in radiation damage to potassium ion permeability of Escherichia coli. *Int J Radiat Biol* **33**: 185-190, 1978.
- 76) Wile AG, Maurice Y, et al: Enhancement tumor growth in experimental whole body hyperthermia. *J Surg Oncol* **24**: 119-123, 1983.
- 77) Winterborun CC: Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem J* **182**: 625-628, 1979.
- 78) Yamada K, Hayakawa T, et al: Regional blood flow and capillary permeability in the ethylnitrosourea-induced rat glioma. *J Neurosurg* **55**: 922-928, 1981.